

氨基葡萄糖类药物的来源、结构及其鉴别技术研究



但晓梦^{1,2}, 刘晓锋^{1,2}, 郭江红^{1,2}, 姜红^{1,2}

1. 湖北省药品监督检验研究院 (武汉 430073)

2. 国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室 (武汉 430073)

【摘要】目的 对氨基葡萄糖类药物的来源、结构及其鉴别技术相关研究进行梳理与归纳, 为该类药物的开发与研究提供参考。方法 通过稳定同位素比值检查法鉴别氨基葡萄糖类药物的来源, 采用 X 射线粉末衍射技术鉴别氨基葡萄糖类药物的晶型结构。结果 碳同位素比值在 $-11‰$ ~ $-13‰$ 区间内的氨基葡萄糖原料属于微生物发酵来源; 碳同位素比值在 $-17‰$ ~ $-24‰$ 区间内的氨基葡萄糖原料属于动物来源。盐酸氨基葡萄糖的最强衍射峰 2θ 角依次为 16.525° 、 12.360° 、 17.330° , 硫酸钠的最强衍射峰 2θ 角为 32.124° 、 19.035° , 硫酸氨基葡萄糖氯化钠 / 钾原料药的最强衍射峰 2θ 角为 27.036° , 盐酸氨基葡萄糖 + 硫酸钠 / 钾混合物 (2 : 1) 的最强衍射峰 2θ 角为 12.391° , 通过 X 射线粉末衍射技术, 一定程度上可以区分硫酸氨基葡萄糖氯化钠 / 钾共晶体复盐与盐酸氨基葡萄糖 + 硫酸钠 / 钾物理混合物。结论 该研究能准确鉴别氨基葡萄糖类药物的来源和结构, 方法简便、准确、专属性强, 为氨基葡萄糖类药物的监督管理提供了技术支持。

【关键词】 盐酸氨基葡萄糖; 硫酸氨基葡萄糖; 来源; 结构; 鉴别

Research on the sources, structures and identification technology of glucosamine drugs

DAN Xiaomeng^{1,2}, LIU Xiaofeng^{1,2}, GUO Jianghong^{1,2}, JIANG Hong^{1,2}

1. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430073, China

2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Blood Products, Wuhan 430073, China

Corresponding author: JIANG Hong, Email: hbyjsjh@163.com; GUO Jianghong, Email: guojh26@hotmail.com

【Abstract】Objective To sort out and summarize the researches of source, structures and identification technologies of glucosamine drugs, and provide a reference for the development and research of this kind of drugs. Methods The sources of glucosamine drugs was identified by stable isotope ratio test, and the crystal structures of glucosamine drugs was identified by X-ray powder diffraction. Results When the carbon isotope ratio was between $-11‰$ and $-13‰$, the source of glucosamine was from microbial fermentation. When the carbon isotope ratio was between $-17‰$ and $-24‰$, the source of glucosamine was from microbial

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202311269

基金项目: 国家药典委员会标准提高项目 (2019H080); 湖北省药品监督管理局青年项目 (20200117)

通信作者: 姜红, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, Email: hbyjsjh@163.com

郭江红, 硕士, 高级工程师, 硕士研究生导师, Email: guojh26@hotmail.com

animals. The 2θ angles of the strongest diffraction peak of hydrochloric glucosamine were 16.525° , 12.360° and 17.330° , the 2θ angles of the strongest diffraction peak of sodium sulfate were 32.124° and 19.035° , the 2θ angle of the strongest diffraction peak of the glucosamine sulfate potassium chloride/sodium was 27.036° , and the 2θ angle of the strongest diffraction peak of the physical mixture of glucosamine hydrochloride and chloride/sodium sulfate (2 : 1) was 12.391° . Through X-ray powder diffraction technology, the glucosamine sulfate potassium chloride/sodium eutectic complex salt and the physical mixture of glucosamine hydrochloride and chloride/sodium sulfate can be distinguished. **Conclusion** The research can effectively identify the sources and structures of glucosamine drugs, which is simple, accurate and reliable, and provides technical support for the supervision and management of glucosamine drugs.

【Keywords】 Hydrochloric glucosamine; Sulfate glucosamine; Source; Structure; Identification

氨基葡萄糖是软骨基质中合成蛋白聚糖所必需的重要成分, 蛋白聚糖可以通过抑制胶原纤维的拉伸力来使关节软骨具有吸收冲击力的功能。在关节退行性疾病的早期, 软骨的弹性不断减弱并逐渐出现关节炎的诸多症状, 氨基单糖可刺激软骨细胞产生具有正常多聚体结构的糖蛋白, 抑制一些可损害关节软骨的酶, 防止皮质激素及某些非甾体抗炎药物对软骨细胞的损害及减少损伤细胞的内毒素因子的释放, 从而改善关节软骨代谢。在关节炎的发展进程中, 补充外源性的氨基葡萄糖可能起到有益的作用, 氨基葡萄糖能为人体大量催生和补充关节滑液, 从而不断润滑关节软骨面, 减少磨损, 使关节部位灵活自如, 临床上主要用于治疗骨性关节炎, 提高关节和机体的免疫力^[1-5]。

当前, 随着人们对身体健康的重视程度逐年提高, 氨基葡萄糖类药物应用于治疗骨性关节炎的临床使用量逐年递增, 致使市场上出现了不同合成来源和不同晶型结构的氨基葡萄糖类药物, 使得产品的安全性和有效性保障受到影响。因此, 本文从技术支撑和行政监管的角度, 探索了通过稳定同位素比值检查法鉴别氨基葡萄糖类药物来源于甲壳素还是生物发酵, 通过 X 射线粉末衍射 (X-ray power diffraction, XRPD) 法鉴别氨基葡萄糖类药物的晶型结构为共晶体复盐还是物理混合物, 试图从研究思路与技术难点两个方面, 为该类药物的质量安全提供鉴别技术。

1 材料

1.1 主要仪器

Delta Plus AD 型稳定性同位素质谱仪和

EA1112 型全自动元素分析仪 (德国 Thermo-Finnigan 公司); X'Pert3 Powder 型 XRPD 仪 (荷兰帕纳科公司)。

1.2 主要药品与试剂

盐酸氨基葡萄糖 (企业 A, 批号: 201001; 企业 B, 批号: 20161013; 企业 C, 批号: 1803-2018-11021; 企业 G, 批号: 170726805; 企业 H, 批号: 201708077; 企业 I, 批号: 012170801-13); 硫酸氨基葡萄糖氯化钠 (企业 D, 批号: 190118、150434; 企业 J, 批号: 140846-201901); 硫酸氨基葡萄糖氯化钾 (企业 E, 批号: 210701; 企业 F, 批号: 201509); 盐酸氨基葡萄糖与硫酸钠混合物 (实验室自制, 批号: 20220208); 盐酸氨基葡萄糖与硫酸钾混合物 (实验室自制, 批号: 20220208)。

2 方法与结果

2.1 氨基葡萄糖类药物的来源鉴定

稳定同位素比值检查法是使用碳氮分析仪, 经还原炉与同位素质谱仪连接, 推定分析氧化炉温度和还原炉温度, 寻找适宜的内标物质, 对样品组进行碳氮同位素比值法测定。

氨基葡萄糖分子中含碳和氮两个稳定同位素, 由于同位素分馏过程使来源不同环境的甲壳素存在同位素比值差异, 由此制得的氨基葡萄糖中碳氮同位素比值存在明显的不同。凭借碳氮同位素比值差异, 建立指标达到鉴别氨基葡萄糖原料药成品到底是来源于生物提取法还是微生物发酵法。依据《同位素质谱地质样品分析方法总则及一般规定 DZ/T 0184.1-1997》^[6]、《地质样品有机地

球化学分析方法 GB/T 18340.2-2010》^[7]，采用在线同位素分析法对不同来源的氨基葡萄糖类药物原料药进行碳同位素和氮同位素检测。

2.1.1 方法

在线同位素分析法。以皮狄箭石 (PeeDee Belemnie, PDB) 为碳同位素的国际标准和大气氮为同位素参比标准，计算样品中碳同位素比值和氮同位素比值。使用元素分析仪，经 Conflo III 与同位素质谱分析仪连接，在线进行样品分析。元素分析仪氧化炉温度：1 020 ℃，还原炉温度：650 ℃，极性色谱柱温度：40 ℃，载气：氮气 (99.999%)，流量：90~100 mL/min。分别用 IAEA-600、GBW4407 和 IAEA-N-1 标准物质对实验室钢瓶的二氧化碳和氮气进行标定。碳氮同位素分别以 PDB 国际标准和大气氮为参考标准。重复样品分析双差：碳同位素为 ±0.2‰，氮同位素为 ±0.2‰。

样品制备：冷冻干燥或 50 ℃ 以下烘干，以去除水分。

2.1.2 结果

由于生物发酵来源和动物来源的氨基葡萄糖类药物原料药的生物种群不一样，同位素分馏程度不同，动物来源的分馏程度较高，生物发酵来源的分馏程度较低，一般来说碳同位素比值在 -27‰~-18‰说明氨基葡萄糖类药物原料药来源于动物提取^[6-7]。对市场上收集的 9 家企业的 10 批样品进行测定，结果见表 1、图 1 和图 2。通过下表可知企业 D、G、H、I 的碳同位素比值在 -11‰~-13‰区间内，由此看出其生产的氨基葡萄糖原料药不属于动物来源；企业 A、B、C、E、F 的碳同位素比值在 -17‰~-24‰区间内，由此看出其生产的氨基葡萄糖原料药属于动物来源，说明通过稳定同位素比值检查法能明显看出不同来源的氨基葡萄糖类药物原料药中碳氮同位素比值存在明显的不同。凭借碳氮同位素比值差异，可以鉴别氨基葡萄糖原料药成品到底是来源于甲壳素提取还是发酵法生产。

表1 市场收集样品的有机碳及氮同位素比值

Table 1. The organic carbon and nitrogen isotopes of samples collected in the market

生产企业	批号	样品名称	碳同位素 (‰)		氮同位素 (‰)	
A	201001	盐酸氨基葡萄糖	-20.53	-20.65	-3.66	-3.69
B	20161013	盐酸氨基葡萄糖	-17.25	-17.18	-1.62	-1.53
C	1803-2018-11021	盐酸氨基葡萄糖	-23.86	-23.83	-4.82	-4.94
D	190118	硫酸氨基葡萄糖氯化钠	-12.03	-11.83	-5.69	-5.87
D	150434	硫酸氨基葡萄糖氯化钠	-14.31	-14.28	-5.39	-5.33
E	210701	硫酸氨基葡萄糖氯化钾	-24.11	-24.18	-6.18	-6.04
F	201509	硫酸氨基葡萄糖氯化钾	-21.12	-21.17	-3.47	-3.43
G	170726805	盐酸氨基葡萄糖	-11.25	-11.30	-6.07	-6.18
H	201708077	盐酸氨基葡萄糖	-11.98	-11.94	-7.19	-7.17
I	012170801-13	盐酸氨基葡萄糖	-12.01	-12.15	-7.61	-7.78

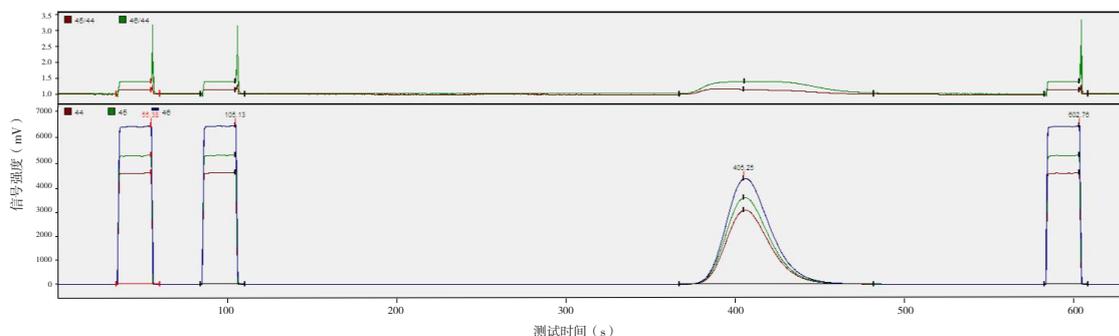


图1 盐酸氨基葡萄糖碳稳定同位素质谱图 (企业C, 批号: 1803-2018-11021)

Figure 1. The carbon stable isotope mass spectrometry of glucosamine hydrochloride (enterprise C, batch: 1803-2018-11021)

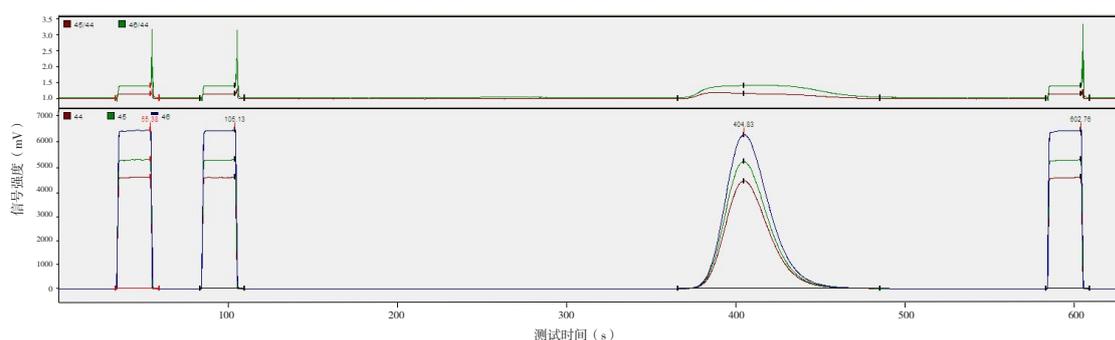


图2 硫酸氨基葡萄糖氯化钠碳稳定同位素质谱图 (企业D, 批号: 150434)

Figure 2. The carbon stable isotope mass spectrometry of glucosamine sulfate potassium sodium (enterprise D, batch: 150434)

2.2 硫酸氨基葡萄糖类药物的结构鉴定

通过 XRPD 技术对市场上收集的氨基葡萄糖类药物原料药进行 XRPD, 分析其衍射图谱, 获得原料药的成分、材料内部原子或分子的结构及形态等信息的研究手段。当物质 (晶体或非晶体) 进行衍射分析时, 该物质被 X 射线照射产生不同程度的衍射现象, 物质组成、晶型、分子内成键方式、分子的构型、构象等决定该物质产生特有的衍射图谱, 使用 XRPD 技术物相鉴定功能, 分析各结晶相的比例, 以此判断企业生产的硫酸氨基葡萄糖氯化钾 / 钠原料药是否为晶体、是何种晶体物质以及其晶型结构。

基葡萄糖氯化钾 / 钠原料药是否为晶体、是何种晶体物质以及其晶型结构。

2.2.1 方法

取样品少量研磨, 压制在光盘上, 压平整、均匀 (尺寸为 10 mm × 10 mm, 厚度为 17 μm), 进行光斑扫描, 扫描角度范围: 0~150°, 转速: 8 °/min。

2.2.2 结果

取市场上收集到的 7 批氨基葡萄糖类药物, 测定各个样品的最强衍射峰 2θ, 测定结果见表 2。

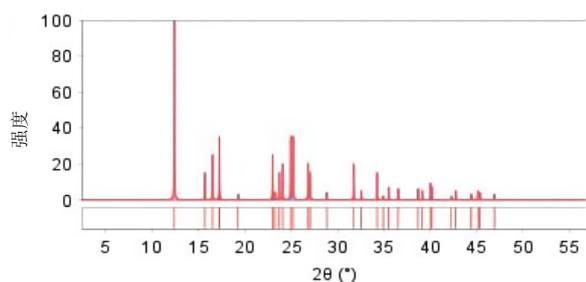
表2 XRPD被测样品信息表

Table 2. XRPD sample information Sheet

被测样品名称	生产企业	批号	最强衍射峰2θ (°)
盐酸氨基葡萄糖	A	201001	16.525
盐酸氨基葡萄糖	C	1803-2018-11021	16.525
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	D	9051-A190118	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	D	9051-150434	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钾	E	210701	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钾	F	未知	27.036
盐酸氨基葡萄糖与硫酸钠混合物 (2:1)	实验室自制	20220208	12.391
盐酸氨基葡萄糖与硫酸钾混合物 (2:1)	实验室自制	20220208	12.391
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	J	140846-201901	12.391

从盐酸氨基葡萄糖和硫酸钠的 XRPD 标准图看, 盐酸氨基葡萄糖的最强衍射峰 2θ 位置在 16.525°、12.360°、17.330° 处, 硫酸钠的最强衍射峰 2θ 位置在 32.124°、19.035° 处 (图 3 和图 4)。从测定结果可以看出, 硫酸氨基葡萄糖氯化钠 / 钾原料药的最强衍射峰 2θ 位置在 27.036° 处,

盐酸氨基葡萄糖 + 硫酸钠 / 钾混合物 (2:1) 的最强衍射峰 2θ 位置在 12.391° 处 (图 5), 两种样品的最强衍射峰存在差异, 说明通过 XRPD 技术, 一定程度上可以区分硫酸氨基葡萄糖氯化钠 / 钾共晶体复盐与盐酸氨基葡萄糖 + 硫酸钠 / 钾混合物。

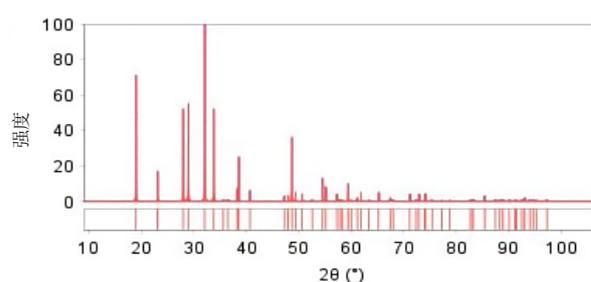


© 2022 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

— C6 H13 N O5 · H Cl - 00-030-1735 (Exp-based)
— C6 H13 N O5 · H Cl - 00-030-1735 (Stick, Fixed Slit Intensity)

图3 盐酸氨基葡萄糖XRPD标准图
(卡片号: 00-030-1735)

Figure 3. The XRPD standard picture of glucosamine hydrochloride (card number: 00-030-1735)



© 2022 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

— Na2 S O4 - 00-037-1465 (Exp-based)
— Na2 S O4 - 00-037-1465 (Stick, Fixed Slit Intensity)

图4 硫酸钠XRPD标准图
(卡片号: 00-037-0808)

Figure 4. The XRPD standard picture of sodium sulfate (card number: 00-037-0808)

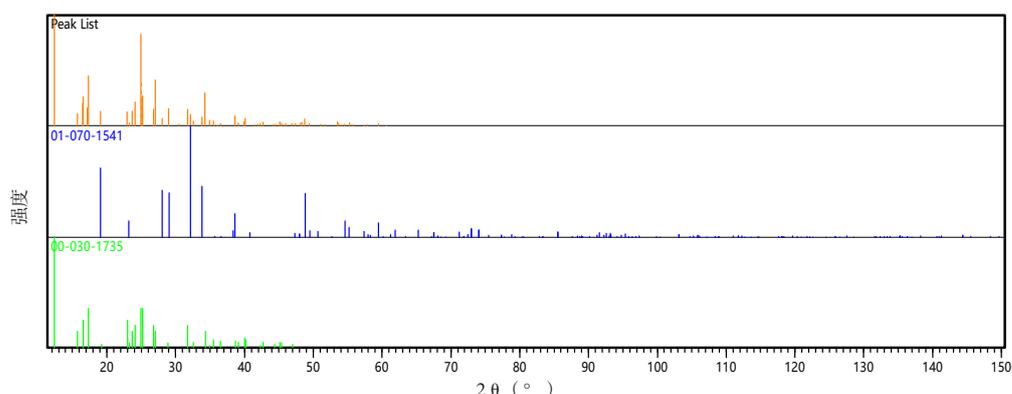


图5 盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠混合物(2:1)、盐酸氨基葡萄糖和硫酸钠XRPD堆栈图

Figure 5. XRPD stack diagram of the physical mixture of glucosamine hydrochloride and sodium sulfate (2:1), glucosamine hydrochloride and sodium sulfate

3 讨论

氨基葡萄糖是一种重要的氨基己糖, 其由葡萄糖的 1 个羟基被氨基取代形成, 氨基葡萄糖由于存在活性氨基基团, 化学性质不稳定, 在空气中易氧化, 目前市场上的氨基葡萄糖主要以成盐形式存在, 主要分为 3 种: 盐酸氨基葡萄糖、硫酸氨基葡萄糖氯化钾和硫酸氨基葡萄糖氯化钠^[8]。

目前, 国内关于氨基葡萄糖原料的来源有 2 种: 一种是动物性原料主要以甲壳类动物的外壳为主, 通过酸解法、酶解法制得氨基葡萄糖; 另一种是植物性原料, 主要以工业发酵柠檬酸的废弃玉米、大米、稻谷渣等, 通过微生物发酵法生产氨基葡萄糖^[9-16]。但国内氨基葡萄糖原料药的注册生产工艺仅批准了以甲壳素为来源的生产工艺, 但市场上存在以微生物法生产氨基葡萄糖

来掺杂或替代以甲壳类为原料生产氨基葡萄糖的情况。鉴于此, 通过稳定同位素-质谱测定法鉴别市场上动物来源和植物来源生产的氨基葡萄糖原料。

硫酸氨基葡萄糖类药物的结构应为硫酸氨基葡萄糖与氯化钾/氯化钠的共晶体复盐, 但市场上采用盐酸氨基葡萄糖与无效的无机物硫酸钠/钾的混合物取而代之, 而现行的药物质量控制要素无法区分药物结构, 致使企业造假风险成本较低^[17]。

本文针对硫酸氨基葡萄糖氯化钾/氯化钠原料药是硫酸氨基葡萄糖氯化钾/钠共晶体复盐还是盐酸氨基葡萄糖与硫酸钾/钠的混合物的成盐问题, 对企业生产的原料药、实验室自制的盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠/钾混合物(2:1)进行 XRPD 试验加以验证和鉴别。通过 XRPD 法区分氨基葡萄糖类药物晶型结构, 以鉴别市场上氨基

葡萄糖类药物原料药晶型结构,防止采用盐酸氨基葡萄糖与无效的无机物硫酸钠或硫酸钾的混合物替代硫酸氨基葡萄糖与氯化钾或氯化钠的共晶体复盐的行为,为药品行政监管提供了较好的技术支持。

参考文献

- 1 纪立伟,傅得兴.氨基葡萄糖的药理作用及安全性[J].中国药学杂志,2007,42(19):1513-1516.[Ji LW, Fu DX. Pharmacology and safety of glucosamine[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2007, 42(19): 1513-1516.] DOI: 10.3321/j.issn:1001-2494.2007.19.022.
- 2 韩丽华.盐酸氨基葡萄糖胶囊治疗骨关节炎的现状 & 进展研究[J].中国现代药物应用,2020,14(8):232-233.[Han LH. The status and research progress of glucosamine hydrochloride capsules in the treatment of osteoarthritis[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2020, 14(8): 232-233.] DOI: 10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2020.08.110.
- 3 但晓梦,谢育媛,郭江红,等.盐酸氨基葡萄糖颗粒有关物质方法的建立与验证[J].中国药师,2022,25(7):1282-1287.[Dan XM, Xie YY, Guo JH, et al. Establishment and Validation of the Determination Method for the Related Substance in Glucosamine Hydrochloride Granules[J]. China Pharmacist, 2022, 25(7): 1282-1287.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.07.034.
- 4 European Food Safety Authority. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to glucosamine and maintenance of joints pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006[J]. EFSA J, 2011, 9(12): n/a-n/a. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2476.
- 5 Mccarty MF, O'Keefe JH, Dinicolantonio J. Glucosamine for the treatment of osteoarthritis: the time has come for higher-dose trials[J]. J Diet Suppl, 2019, 16(2): 179-192. DOI: 10.1080/19390211.2018.1448920.
- 6 同位素地质样品分析方法总则及一般规定[S]. DZ/T 0184.1-1997. 1997.
- 7 地质样品有机地球化学分析方法[S]. GB/T 18340.2-2010. 2010.
- 8 张森.硫酸氨基葡萄糖制剂的质量研究[D].杭州:浙江工业大学,2019.
- 9 迟海林,李菲菲,张李伟,等.氨基葡萄糖类物质在保健食品中的应用及研究进展[J].食品工业科技,2023 44(8): 437-445.[Chi HL, Li FF, Zhang LW, et al. Application and research progress of glucosamine in health food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 437-445.] DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050211.
- 10 李旭,李康,汪俊卿,等.氨基葡萄糖微生物合成研究进展[J].齐鲁工业大学学报,2021,35(1):19-22.[Li X, Li K, Wang JQ, et al. Research progress of glucosamine microbial synthesis[J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry (Natural Science Edition), 2021, 35(1): 19-22.] DOI: 10.16442/j.cnki.qlydxxb.2021.01.004.
- 11 孙丽.虾头制备盐酸氨基葡萄糖的优化研究[J].福建分析测试,2018,27(3):15-19.[Sun L. Optimization research of preparation of glucosamine hydrochloride from shrimp head[J]. Fujian Analysis & Testing, 2018, 27(3): 15-19.] DOI: 10.3969/j.issn.1009-8143.2018.03.04.
- 12 Zhang HK, Lu YT, Wang YH, et al. D-glucosamine production from chitosan hydrolyzation over a glucose-derived solid acid catalyst[J]. RSC Adv, 2018, 8(10): 5608-5613. DOI: 10.1039/c7ra12490b.
- 13 张健.一种硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐的合成方法:中国专利,110903330A[P].2020-03-24.
- 14 王升,李丕武,刘佃磊,等.利用发酵法生产氨基葡萄糖的研究进展[J].生物技术通报,2014,(1):68-74.[Wang S, Li PW, Liu DL, et al. Review on research progresses in the fermentation methods to produce glucosamine[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, (1): 68-74.] DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2014.01.010.
- 15 刘佃磊,李丕武,李瑞瑞,等.高产氨基葡萄糖基因工程菌的研究进展[J].生物技术通报,2014(3):36-41.[Liu DL, Li PW, Li RR, et al. Research advance of the construction of gene engineering strains for glucosamine[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(3): 36-41.] DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2014.03.005.
- 16 Yeon JC, Eun JK, Zhe P, et al. Purification and characterization of chitosanase from Bacillus sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides [J]. Appl Envir Microbiol, 2004, 70(8): 4522-4531. DOI: 10.1128/AEM.70.8.4522-4531.2004.
- 17 但晓梦.氨基葡萄糖类药物质量控制的研究[D].武汉:华中科技大学,2012.

收稿日期:2023年11月28日 修回日期:2024年03月13日
本文编辑:钟巧妮 李阳